

JC02 Rec'd PCT/PTC 27 APR 2005 ^{PCT}

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Group
Art Unit: Unknown

Attorney
Docket No.: HER0071

Applicant: Ono Etsuro et al.

Invention: METHOD FOR PRODUCING A
MAMMAL PROVIDED WITH
RESISTANCE TO AN ALPHA-HERPES
VIRUS MEDIATED INFECTION AND
MAMMAL OBTAINED BY
IMPLEMENTING SAID METHOD AND
SAID MAMMAL'S PROGENY

Serial No: 10/530,539

Filed: April 6, 2005

Examiner: Unknown

Certificate Under 37 C.F.R. 1.8(a)

I hereby certify that this correspondence is being
deposited with the United States Postal Service as
first class mail in an envelope addressed to:
Commissioner for Patents, P.O. Box 1450,
Alexandria, VA 22313-1450.

on April 25, 2005

Anthony Niewyk

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicant hereby claims the priority of French Patent Application No. 02 12 775 filed
October 15, 2002, under the provisions of 35 U.S.C. 119.

A Certified copy of the priority document is enclosed herewith.

Respectfully submitted,

Anthony Niewyk, Reg. No. 24,871
Attorney for Applicant

AN/mld/377941
BAKER & DANIELS
111 EAST WAYNE STREET, SUITE 800
FORT WAYNE, IN 46802
TELEPHONE: 260-424-8000
FACSIMILE: 260-460-1700



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 18 MARS 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE
26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260599

REMISE DES PIÈCES DATE 15 OCT. 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0212775 DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 15 OCT. 2002		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET HERRBURGER 115 Boulevard Haussmann 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif)			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		FRANCE HYBRIDES	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	Domaine du Grand Puits	
	Code postal et ville	45110	CHATEAUNEUF SUR LOIRE
Pays		FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 15 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0212775 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 W / 260899	
Vos références pour ce dossier : (facultatif)			
6 MANDATAIRE			
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société CABINET HERRBURGER			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse		Rue 115 Boulevard Haussmann	
		Code postal et ville 75008 PARIS	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 51 68 00	
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Païement échelonné de la redevance		Païement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) CABINET HERRBURGER Pierre HERRBURGER CPI 92.114		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

On connaît différents virus de type herpès qui se distinguent par leur génome ainsi que par leurs caractéristiques biologiques.

Une sous famille de ces virus correspond aux alpha herpès virus parmi lesquels on peut nommer les virus herpès simplex humain de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2), le virus de la maladie d'Aujeszky ou Pseudorabies virus (PRV) et l'herpès virus bovin de type 1 (BHV-1).

Tous ces virus présentent la particularité d'être neurotropes et d'avoir un cycle de réplication très bref et un large spectre d'hôte.

L'infection par ces virus provoque des lésions de l'épiderme, se situant en règle générale au niveau des muqueuses, suivies d'une propagation du virus au système nerveux pouvant y entraîner des inflammations aiguës, ainsi que des infections latentes.

Parmi les alpha herpès virus entraînant les ravages les plus importants, on peut citer le virus PRV qui est un agent pathogène d'une importance économique majeure en production porcine tant par le coût direct des pathologies induites que par celui des moyens de lutte mis en œuvre.

Ce virus est largement présent dans la plupart des régions de forte production porcine (Europe, Amérique du Nord, Asie).

Il existe actuellement plusieurs vaccins contre le virus PRV qui représentent un marché important à l'échelle mondiale.

Une telle vaccination n'est cependant pas sans inconvénients compte tenu en particulier du coût entraîné par la nécessité de vacciner une large proportion des animaux d'un troupeau et les problèmes pratiques liés à cette nécessité qui rendent cette opération particulièrement inconfortable, ce d'autant plus qu'il est en général nécessaire de faire plusieurs injections.

Le coût et les contraintes de cette opération peuvent en limiter l'usage et par là même également l'efficacité.

Des stratégies d'éradication du virus sont également utilisées avec des résultats variables mais toujours fragiles.

Par suite, la conception d'un procédé permettant d'engendrer des lignées de porcs transgéniques constitutivement résistants au virus PRV aurait un intérêt économique considérable.

L'invention a pour objet de proposer un tel procédé.

Celui-ci a pu être conçu grâce à des recherches préalables effectuées sur un modèle souris, qui tout comme le porc est sensible à certains alpha herpès virus et en particulier aux virus HSV1 et PRV.

Il est connu que les alpha herpès virus se lient aux cellules d'abord grâce à l'interaction d'une glycoprotéine virale gC, entrant dans la constitution de la membrane du virion et de l'héparane sulfate présent à la surface des cellules, alors que la fusion ultérieure entre l'enveloppe du virion et la membrane cellulaire fait, quant à elle, intervenir d'autres glycoprotéines (gB, gD, gH et gL).

De nombreux travaux ont porté sur l'étude de récepteurs potentiels des alpha herpès virus présents à la surface des cellules de mammifères hôtes ayant une capacité de fixation de la particule virale et pouvant éventuellement neutraliser ainsi son pouvoir infectieux.

Quatre récepteurs humains des alpha herpès virus ont été identifiés à ce jour à savoir :

- le HVEM ou HveA qui est un médiateur d'entrée des virus HVS1 et HVS2 mais pas du virus PRV (Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum. B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436).
- trois membres de la superfamille des immunoglobulines (HveB ou nectin-2 ; HveC ou nectin-1 et HveD) (Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G. (1998). The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attribute of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* **72**, 9992-10002 ;
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., Cohen G. H., and Spear, P. G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-1620 ;
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfate heparan sulfate in herpes simplex virus entry. *Cell* **99**, 13-22 ;
- Warner, M. S., Martinez, W., Geraghty, R. J., Montgomery, R. I., Witbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by herpes simplex virus type 2, mutants of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus. *Virology* **246**, 179-189.

Selon les publications Spear, P. G. (1993). Entry of alpha-herpesviruses into cells. *Semin. Virol.* **4**, 167-180 ; Campadelli-Fiume, G., Arsenakis, M., Farabegoli, F., and Roizman, B. (1988). Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J. Virol.* **62**, 159-167, il a été suggéré que, outre la liaison initiale avec l'héparane sulfate, c'est l'interaction de la glycoprotéine gD de l'alpha herpès virus avec un récepteur présent à la surface de la cellule qui permet l'entrée du virus sous une forme infectieuse et que dans certains types de cellules, les virus HSV-1, PRV et BHV-1 peuvent utiliser un récepteur commun de la glycoprotéine gD pour entrer dans la cellule.

Il a été montré que la protéine gD des virus HSV1 et HSV2 est ainsi un ligand fort de la protéine HVEM exprimée par l'homme et de celle exprimée par la souris, ainsi que de la protéine HveC ou nectin-1 exprimée par l'homme.

La protéine gD du virus PRV n'est pas en revanche un ligand de la protéine HVEM mais constitue un ligand fort de la protéine HveC exprimée par le porc, y compris des formes tronquées de celle-ci. (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* **281**, 315-328.).

Ces capacités de liaison à la glycoprotéine virale gD sont plus particulièrement attribuées au domaine V pour HveC et aux deux premiers domaines riches en cystéine (« CRD ») pour HVEM (Structure-Based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HevA (HVEM). Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Wiley DC, Eisenberg RJ, Cohen GH ; *J virol* 2002, Nov 1 ; 76(21) : 10894-10904).

A partir de ces connaissances préalables, il est proposé conformément à l'invention un procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus donné par transgénèse germinale, caractérisé en ce que l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère ou de l'un de ces ancêtres un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire potentiel de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties et d'autre

part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, dans un système d'expression approprié.

5 Selon l'invention, le récepteur de l'alpha herpès virus visé et/ou l'immunoglobuline appartiennent de préférence à l'espèce homologue.

Le récepteur utilisé est une protéine membranaire dont une glycoprotéine virale de surface, telle gD, est un ligand fort, telle que HveC chez le porc pour le virus PRV ou HVEM chez la souris pour le virus HSV-1.

On pourra également n'utiliser qu'une partie du récepteur telle que le domaine V pour HveC ou les deux premiers domaines riches en cystéine pour HVEM, ou même, le cas échéant des formes mutées de ces parties, sélectionnées pour leur capacité de liaison avec le virus.

15 La première étape du procédé conforme à l'invention correspond donc à la préparation du transgène qui peut être effectuée en mettant en œuvre des méthodes bien connues des spécialistes et abondamment décrites dans la littérature constituant à cloner :

1. d'une part, soit l'ADN complémentaire de l'ARN transcrit pour le gène du récepteur cellulaire choisi, à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant le gène de ce récepteur à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc et du fragment génomique correspondant (« minigène »). On utilisera seulement la partie correspondant au domaine extracellulaire de ce récepteur, ou dans une autre version du procédé, uniquement la partie montrée responsable de ses capacités de fixation aux glycoprotéines virales de surface du virion au sein de ce domaine extracellulaire,
2. d'autre part, soit l'ADNc complémentaire de l'ARN transcrit pour l'un des gènes de chaîne lourde pour la classe et la sous-classe d'immunoglobuline choisie (par exemple G1), à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant ce gène de chaîne lourde à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc

et du fragment génomique correspondant (« minigène »). La construction réalisée retiendra avantageusement les régions codant pour les domaines Hinge, CH₂ et CH₃ uniquement de la chaîne lourde d'immunoglobuline choisie (fraction cristallisable).

5 Un exemple d'une telle construction pour l'immunoglobuline humaine G1 est décrit dans la publication CTLA-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. By Peter S. Linsley, William Brady, Mark Urnes, Laura S. Grosmaire, Nitin K. Damle, and Jeffrey A. Ledbetter ; J. Exp. Med. © The Rockefeller University Press ; volume 174, Septem-
10 bre 1991, 561-569.

Les opérations de clonage seront réalisées à partir des connaissances préalables existantes relatives aux gènes utilisés, à savoir leur séquence, leur localisation chromosomique, ceci si possible dans l'espèce homologue, sinon en se basant sur les séquences existantes pour
15 ce gène chez d'autres mammifères.

Ces opérations pourront être réalisées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) précédée d'une étape de transcription reverse pour l'ADN complémentaire ou recherche de clones génomiques susceptibles de s'hybrider avec une sonde spécifique, de produire un
20 amplicon PCR spécifique du gène recherché.

Cette construction sera réalisée de façon à joindre l'ADN codant pour le domaine extracellulaire du récepteur ou l'une de ses parties en 5' de l'ADN codant pour le fragment cristallisable de la chaîne lourde d'immunoglobuline terminé par un codon stop en respectant le cadre de lecture original des deux gènes, et éventuellement la nature et
25 l'efficacité des jonctions introns-extrons s'ils ont été inclus, de façon à assurer, au final, l'expression d'une protéine chimérique constituée pour sa partie amino terminale du polypeptide correspondant au domaine extracellulaire du récepteur cellulaire ou à l'une de ses sous parties (domaine V notamment pour HveC) et pour sa partie carboxi terminale des domaines
30 Hinge CH₂, CH₃ de la chaîne lourde d'immunoglobuline.

Cette construction sera réalisée dans un vecteur d'expression permettant une expression forte de la protéine chimérique dans un ou plusieurs compartiments biologiques de l'hôte où elle permettra la protection des cellules de manière à rendre l'hôte globalement résistant à l'infection initiale ou à son développement. Le procédé consistera
35 notamment à utiliser des systèmes d'expression actifs soit de façon cons-

titutive dans l'ensemble des cellules, soit dans les tissus épithéliaux et/ou dans les tissus du système nerveux.

Le vecteur d'expression pourra comprendre une région promotrice, un signal de terminaison, des éléments stimulateurs de la transcription, des séquences isolatrices du contexte chromatinien, d'autres unités de transcription, tous éléments susceptibles d'assurer l'expression souhaitée.

Le procédé consistera avantageusement en l'emploi de systèmes d'expression constitués à partir de séquences régulatrices clonées chez l'espèce homologue, ou pour l'application à des animaux de rente chez d'autres animaux d'élevage habituellement consommés par l'homme.

La seconde étape du procédé conforme à l'invention consiste à introduire le transgène ainsi obtenu dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère hôte visé par insertion ou recombinaison homologue, là encore par une méthode bien connue des spécialistes de sorte que ce transgène s'intègre dans le patrimoine génétique de ce mammifère.

On pourra notamment utiliser à cette fin la micro injection pronucléaire ou le transfert nucléaire de cellules transformées en culture.

L'invention concerne également un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus ou de l'une de ses parties de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma de préférence de l'espèce homologue.

L'invention concerne également le descendant d'un tel mammifère, ayant hérité par descendance du transgénèse inséré dans le génome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

Selon l'invention, le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus peut avantageusement être la nectin-1 ou HveC, l'alpha herpès virus le virus PRV et le mammifère appartenir à l'espèce porcine.

Il est essentiel conformément à l'invention que l'opération de transgénèse soit une transgénèse germinale de façon que les descendants du mammifère soient eux aussi susceptibles d'exprimer la protéine chimérique.

Plusieurs exemples de séquences de protéines chimériques conformes à l'invention sont représentées ci-dessous :

Il s'agit de séquences en acides aminés exprimées selon le code à une lettre en usage. Elles comprennent le peptide signal à l'extrémité amino terminale qui sera processé lors de la maturation. Elles sont terminées par un codon stop figuré ici par *.

Séquence N°1 : Utilisation du récepteur HVEM cloné chez la souris (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'immunoglobuline humaine G1, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus HSV-1 :

*MEPLPGWGSAPWSQAPTDNTFRLVPCVFLNLLQRISAQPSCRQEEFLVGDECC
PMCNPGYHVKQVCSEHTGTVCAPCPQTYTAHANGLSKCLPCGVCDPDMGLLT
WQECSSWKDTVCRCPGYFCENQDGSCHSTCLQHTTCPPGQORVEKRGTHDQD
TVCADCLTGTFSLGGTQEECLPWTNCSAFQQEVRRGTNSTD*

TTCSS

DPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Séquence N°2 : Utilisation du récepteur HveC cloné chez la porc (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'immunoglobuline humaine G1, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus PRV :

*MARMGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGAHTQVVQVND SMYGFITD VVLHCS
FANPLPGVKITQVTWQKATNGSKQNVAIYNPAMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTD
GTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPAGNRESQLNLTVMKPTNWIEGTQAVLRAKK
GKDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETHLKGEAEYQEIRNPNGTVTVISRYRLVP
SREDHRQSLACIVNYHMDRFRESLT LN VQYEPEVTIEGFDGNWYLQRM DVKLT
CKADANPPATEYHWTTLNGSLPKGVEAQNRTLFRGPINYSMAGTYICEATNPIG
TRSGQVEVNITEF*

PYTPSPPEHA

DPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Plusieurs exemples de séquences de protéines chimériques conformes à l'invention sont jointes en annexe.

Il s'agit de séquences en acides aminés exprimées selon le code à une lettre en usage. Elles comprennent le peptide signal à l'extrémité amino terminale qui sera traité lors de la maturation. Elles sont terminées par un codon stop figure ici par *.

Une protéine chimérique conforme à ce modèle est également décrite dans le document JP-2001-328430 dans le cadre d'une autre application.

La faisabilité du procédé conforme à l'invention a été confirmée par des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus herpes simplex humain de type 1 (HSV-1) de souris transgéniques.

Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur murin HVEM de ce virus et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 humaine.

Le domaine extracellulaire murin HveM a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de rate stimulées par la concavaline A, obtenues sur des souris de souche BALB/c.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TAAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3'.

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. Human Gene Therapy 9, 1739-1745), sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β actin) connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-200).

On a créé par micro injection du fragment PmeI/SalI de ce plasmide, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de

Séquence N°3 : Utilisation du domaine V seul du récepteur HveC cloné chez le porc (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'Immunoglobuline G1 porcine, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus PRV :

5 *MARMGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGAHTQVVQVND*SMYGF~~IGTDVVLHCS~~
FANPLPGVKITQVTWQKATNGSKQNVAIYNPAMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTD
GTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPAGNRESQLNLTVM
 GS
 VGIHQPTCPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDTLMISQTPEVTCVVVDVSK~~EHAE~~
 10 *VQFSWYVDGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLKGKEFKCKV*
NNVDLPAPITRTISKAIGQSREPQVYTLPPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHV
*EWKSNGQPEPENTYRTTPPQQDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFEC*AV
*MHEALHNHYTQKSISKTQGK**

15 Une protéine chimérique conforme à ce modèle est également décrite dans le document JP-2001-328430 dans le cadre d'une autre application.

La faisabilité du procédé conforme à l'invention a été confirmée par des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus herpes simplex humain de type
 20 1 (HSV-1) de souris transgéniques.

Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur murin HVEM de ce virus et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 hu-
 25 maine.

Le domaine extracellulaire murin HveM a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de rate stimulées par la concavaline A, obtenues sur des souris de souche BALB/c.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-
 30 TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3'.

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishi-
 35 kura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. Human Gene Therapy 9, 1739-1745), sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la β actin)

la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés (souris F1 C57 BL/6 X SJL) trois lignées A, B, C de souris transgéniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique HVEM Ig.

La présence de la protéine HVEMIg a été détectée comme bande spécifique révélée par l'anticorps anti-HVEMIg de l'espèce lapine par immunoélectrophorèse dans le sérum des trois lignées de souris transgéniques, avec un titre en moyenne plus faible pour les souris de la lignée B.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 1.

La concentration en protéine chimérique HVEMIg du sérum des souris des trois lignées transgéniques A B C est représentée sur les tableaux 1, 2, 3 et 4 joints en annexe.

Les souris transgéniques de trois lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de ces souris et ceux de leurs homologues non transgéniques de la même portée.

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient effectivement protégées contre le virus HSV-1, on a inoculé par voie intraveineuse et une dose de 10^9 ufc correspondant à dix fois la dose létale (10 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

La DL 50 a été déterminée initialement chez la lignée de souris la moins sensible des deux ayant servi à la production des animaux transgéniques hybrides.

Selon les figures 2, 3, et 4 on a dénombré les souris transgéniques T_g respectivement des lignées A B et C et les souris non transgéniques non T_g demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

On a ainsi pu constater que toutes les lignées de souris transgéniques étaient résistantes au virus HSV-1.

Plus précisément toutes les souris transgéniques des lignées A et C ont survécu à l'inoculation par le virus et sont restées en bonne santé pendant plusieurs mois après l'essai (tableaux 1 et 4).

Seule une souris transgénique de la lignée B, est décédée après l'inoculation par le virus tandis que les six autres ont survécu (ta-

connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-200).

5 On a créé par micro injection du fragment Pmel/Sall de ce plasmide, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés (souris
10 F1 C57 BL/6 X SJL) trois lignées A, B, C de souris transgéniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique HVEM Ig.

La présence de la protéine HVEMIg a été détectée comme bande spécifique révélée par l'anticorps anti-HVEMIg de l'espèce lapine
15 par immunoélectrophorèse dans le sérum des trois lignées de souris transgéniques, avec un titre en moyenne plus faible pour les souris de la lignée B.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 1.

20 La concentration en protéine chimérique HVEMIg du sérum des souris des trois lignées transgéniques A B C est représentée sur les tableaux 1, 2, 3 et 4 joints en annexe.

Les souris transgéniques de trois lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de
25 ces souris et ceux de leurs homologues non transgéniques de la même portée.

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient effectivement protégées contre le virus HSV-1, on a inoculé par voie intraveineuse et une dose de 10^9 ufc
30 correspondant à dix fois la dose létale (10 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

La DL 50 a été déterminée initialement chez la lignée de souris la moins sensible des deux ayant servi à la production des animaux
35 transgéniques hybrides.

Selon les figures 2, 3, et 4 on a dénombré les souris transgéniques T_g respectivement des lignées A B et C et les souris non transgéniques non T_g demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

bleau 3), mais la lignée B est celle pour laquelle les taux sériques mesurés en HVEMIg étaient les plus faibles.

En revanche, six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée A, 13 des 14 souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée B et six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée C ont développé des symptômes tels qu'une paralysie et sont décédées dans les 14 jours qui ont suivi l'inoculation par le virus HSV-1.

On a recherché l'expression du LAT du virus HSV-1 dans les ganglions trigéminaux des souris survivantes après l'inoculation par la méthode décrite dans les publications.

- Spivak, J. G., and Fraser, N. W. (1987). Detection of herpes virus type 1 transcripts during latent infections in mice. *J. Virol.*, **61**, 3841-3847.

- Stevens, J. G., and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-845.

On a ainsi mis en œuvre la méthode de RT-PCR de façon à détecter l'expression du LAT.

Celle-ci a été observée chez les souris non transgéniques ayant développé des symptômes et chez une seule souris transgénique de la lignée B n'ayant pas présenté de symptômes, mais n'a en revanche pas été observée chez toutes les autres souris transgéniques testées ni chez les souris non transgéniques survivantes n'ayant pas développé de symptômes.

Dans le cadre de cette étude on a également effectué un essai de contrôle dans le but de déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient protégées contre le virus PRV ce alors que le récepteur HVEM n'est pas un récepteur de la glycoprotéine gD du virus PRV.

A cet effet, on a inoculé par voie intraveineuse et par une dose correspondant à 10 fois la dose létale (10 LD 50) de virus PRV, des souris transgéniques de la lignée A et des souris non transgéniques de la même portée (tableau 2 et figure 5).

On a ainsi pu constater qu'à l'exception d'une souris transgénique qui a survécu pendant 10 jours toutes les souris sont décédées dans les cinq jours suivant l'inoculation par le virus PRV.

Par suite les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg ne se sont pas révélées protégées contre le virus PRV.

On a ainsi pu constater que toutes les lignées de souris transgéniques étaient résistantes au virus HSV-1.

Plus précisément toutes les souris transgéniques des lignées A et C ont survécu à l'inoculation par le virus et sont restées en bonne santé pendant plusieurs mois après l'essai (tableaux 1 et 4).

Seule une souris transgénique de la lignée B, est décédée après l'inoculation par le virus tandis que les six autres ont survécu (tableau 3), mais la lignée B est celle pour laquelle les taux sériques mesurés en HVEMlg étaient les plus faibles.

En revanche, six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée A, 13 des 14 souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée B et six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée C ont développé des symptômes tels qu'une paralysie et sont décédées dans les 14 jours qui ont suivi l'inoculation par le virus HSV-1.

On a recherché l'expression du LAT du virus HSV-1 dans les ganglions trigéminaux des souris survivantes après l'inoculation par la méthode décrite dans les publications.

- Spivak, J. G., and Fraser, N. W. (1987). Detection of herpes virus type 1 transcripts during latent infections in mice. *J. Virol.*, **61**, 3841-3847.
- Stevens, J. G., and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-845.

On a ainsi mis en œuvre la méthode de RT-PCR de façon à détecter l'expression du LAT.

Celle-ci a été observée chez les souris non transgéniques ayant développé des symptômes et chez une seule souris transgénique de la lignée B n'ayant pas présenté de symptômes, mais n'a en revanche pas été observée chez toutes les autres souris transgéniques testées ni chez les souris non transgéniques survivantes n'ayant pas développé de symptômes.

Dans le cadre de cette étude on a également effectué un essai de contrôle dans le but de déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMlg étaient protégées contre le virus PRV ce alors que le récepteur HVEM n'est pas un récepteur de la glycoprotéine gD du virus PRV.

A cet effet, on a inoculé par voie intraveineuse et par une dose correspondant à 10 fois la dose létale (10 LD 50) de virus PRV, des

Dans le cadre de cette étude, on a également cherché à déterminer si la résistance des souris transgéniques à l'inoculation par le virus HSV-1 ayant pu être constatée *in vivo* s'accompagnait en parallèle d'une résistance des cellules de ces souris une fois isolées.

5 A cet effet on a inoculé des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus HSV-1.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 5 jours après l'inoculation, et constaté que
10 le nombre de ces plages était nettement plus important dans le cas des fibroblastes de souris non transgéniques que dans le cas de fibroblastes de souris transgéniques.

On a parallèlement effectué un test similaire pour le virus PRV en inoculant des cultures de fibroblastes embryonnaires issus de
15 souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus PRV, sans constater de différences notables entre le nombre de plages de lyse observé chez les souris transgéniques et chez les souris non transgéniques.

Ces résultats sont de nature à prouver que la protéine chimérique HVEMIg exprimée par les fibroblastes des souris transgéniques
20 intervient dans l'inhibition de l'adsorption du virus HSV-1 par ces fibroblastes embryonnaires.

Dans un test complémentaire dont les résultats sont illustrés sur le tableau 5 on a recherché si la protéine chimérique HVEMIg
25 présente dans le sérum de souris transgéniques pouvait inhiber la contamination de cultures cellulaires par les virus HSV-1 ou PRV.

Dans ce but, on a recueilli du sérum de souris transgéniques de la lignée C et incubé avec un inoculat de ce sérum le virus HSV-1 ou le virus PRV avant de le mettre en contact avec des cultures de cellules
30 Vero.

On a ainsi pu établir que le sérum de souris transgéniques de la lignée C peut protéger des cellules Vero d'une contamination par le virus HSV-1 mais pas d'une contamination par le virus PRV.

Un test de contrôle effectué avec du sérum de souris non
35 transgéniques n'a au contraire pas permis de constater d'activité antivirale.

On a par ailleurs constaté que le sérum des souris transgéniques de la lignée C ne présente plus d'activité antivirale après qu'il ait

souris transgéniques de la lignée A et des souris non transgéniques de la même portée (tableau 2 et figure 5).

On a ainsi pu constater qu'à l'exception d'une souris transgénique qui a survécu pendant 10 jours toutes les souris sont décédées dans les cinq jours suivant l'inoculation par le virus PRV.

Par suite les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMlg ne se sont pas révélées protégées contre le virus PRV.

Dans le cadre de cette étude, on a également cherché à déterminer si la résistance des souris transgéniques à l'inoculation par le virus HSV-1 ayant pu être constatée *in vivo* s'accompagnait en parallèle d'une résistance des cellules de ces souris une fois isolées.

A cet effet, on a inoculé des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus HSV-1.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 5 jours après l'inoculation, et constaté que le nombre de ces plages était nettement plus important dans le cas des fibroblastes de souris non transgéniques que dans le cas de fibroblastes de souris transgéniques.

On a parallèlement effectué un test similaire pour le virus PRV en inoculant des cultures de fibroblastes embryonnaires issus de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus PRV, sans constater de différences notables entre le nombre de plages de lyse observé chez les souris transgéniques et chez les souris non transgéniques.

Ces résultats sont de nature à prouver que la protéine chimérique HVEMlg exprimée par les fibroblastes des souris transgéniques intervient dans l'inhibition de l'adsorption du virus HSV-1 par ces fibroblastes embryonnaires.

Dans un test complémentaire dont les résultats sont illustrés sur le tableau 5 on a recherché si la protéine chimérique HVEMlg présente dans le sérum de souris transgéniques pouvait inhiber la contamination de cultures cellulaires par les virus HSV-1 ou PRV.

Dans ce but, on a recueilli du sérum de souris transgéniques de la lignée C et incubé avec un inoculat de ce sérum le virus HSV-1 ou le virus PRV avant de le mettre en contact avec des cultures de cellules Vero.

été mis en contact avec un sérum polyclonal anti-HVEMlg produit par hyperimmunisation sur lapin pendant 30 minutes à température ambiante.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité antivirale constatée provient de la protéine chimérique HVEMlg présente dans le
5 sérum des souris transgéniques, mais sont également sans doute associés à l'expression de cette protéine chimérique à la surface des cellules de l'hôte telles les fibroblastes embryonnaires évalués dans ces tests.

On a ainsi pu établir que le sérum de souris transgéniques de la lignée C peut protéger des cellules Vero d'une contamination par le virus HSV-1 mais pas d'une contamination par le virus PRV.

Un test de contrôle effectué avec du sérum de souris non
5 transgéniques n'a au contraire pas permis de constater d'activité antivirale.

On a par ailleurs constaté que le sérum des souris transgéniques de la lignée C ne présente plus d'activité antivirale après qu'il ait été mis en contact avec un sérum polyclonal anti-HVEMIg produit par hyperimmunisation sur lapin pendant 30 minutes à température ambiante.
10

L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité antivirale constatée provient de la protéine chimérique HVEMIg présente dans le sérum des souris transgéniques, mais sont également sans doute associés à l'expression de cette protéine chimérique à la surface des cellules de
15 l'hôte telles les fibroblastes embryonnaires évalués dans ces tests.

TABLEAU 1
Résistance des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
I	A1	M	14.8	-	
	A2	M	10.0	-	
	A3	M	11.6	-	
	A4	F	7.6	-	
	A5	F	8.3	-	
	A6	F	10.0	-	
	A7	F	24.6	-	
	A8	F	8.5	-	
	A9	F	7.9	-	
	A10	F	7.3	-	
	L1	M	1.5	-	
	L2	M	1.1	-	
	L3	M	1.6	+	4
	L4	M	0.8	+	14
	L5	M	1.6	+	
	L6	F	0.6	+	5
II	A11	M	10.1		
	A12	M	15.9		
	A13	M	10.5		
	A14	M	9.3		
	A15	F	7.3		
	A16	F	14.0		
	A17	F	15.4		
	A18	F	14.9		
	L7	M	0.4	+	4
	L8	M	0.5	+	
	L9	F	0.5	+	

TABLEAU 1
Résistance des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus HSV-1.

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
I	A1	M	14.8	-	
	A2	M	10.0	-	
	A3	M	11.6	-	
	A4	F	7.6	-	
	A5	F	8.3	-	
	A6	F	10.0	-	
	A7	F	24.6	-	
	A8	F	8.5	-	
	A9	F	7.9	-	
	A10	F	7.3	-	
	L1	M	1.5	-	
	L2	M	1.1	-	
	L3	M	1.6	+	4
	L4	M	0.8	+	14
	L5	M	1.6	+	
	L6	F	0.6	+	5
II	A11	M	10.1		
	A12	M	15.9		
	A13	M	10.5		
	A14	M	9.3		
	A15	F	7.3		
	A16	F	14.0		
	A17	F	15.4		
	A18	F	14.9		
	L7	M	0.4	+	4
	L8	M	0.5	+	
	L9	F	0.5	+	

TABLEAU 2
Sensibilité des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus PRV

	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
	A19	M	41.2	+	4
	A20	F	19.4	+	10
	A21	F	29.6	+	5
	A22	F	24.2	+	5
	A23	F	20.2	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5

TABLEAU 2
Sensibilité des souris transgéniques de la lignée A
à une inoculation par le virus PRV

	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
	A19	M	41.2	+	4
	A20	F	19.4	+	10
	A21	F	29.6	+	5
	A22	F	24.2	+	5
	A23	F	20.2	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5

TABLEAU 3
Résistance des souris transgéniques de la lignée B
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMIg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
I	B1	M	8.5	-		-
	B2	M	7.8	-		-
	B3	M	7.7	-		-
	B4	F	8.1	+	11	
	L1	M	0.4	+	6	
	L2	M	0.7	+	6	
	L3	M	0.5	+	5	
	L4	M	0.7	+	7	
	L5	F	0.3	+	5	
II	B5	M	5.0	-		+
	B6	M	6.2	-		-
	B7	F	4.4	-		-
	L6	M	0.6	-		
	L7	M	0.6	+	10	
	L8	M	0.5	+	7	
	L9	M	0.6	+		+
	L10	F	0.4	+	7	
	L11	F	0.5	+	5	
	L12	F	0.5	+	5	
	L13	F	0.5	+	5	
	L14	F	0.4	+	6	

TABLEAU 3
Résistance des souris transgéniques de la lignée B
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
I	B1	M	8.5	-		-
	B2	M	7.8	-		-
	B3	M	7.7	-		-
	B4	F	8.1	+	11	
	L1	M	0.4	+	6	
	L2	M	0.7	+	6	
	L3	M	0.5	+	5	
	L4	M	0.7	+	7	
	L5	F	0.3	+	5	
	B5	M	5.0	-		+
	B6	M	6.2	-		-
	B7	F	4.4	-		-
II	L6	M	0.6	-		
	L7	M	0.6	+	10	
	L8	M	0.5	+	7	
	L9	M	0.6	+		+
	L10	F	0.4	+	7	
	L11	F	0.5	+	5	
	L12	F	0.5	+	5	
	L13	F	0.5	+	5	
	L14	F	0.4	+	6	

TABLEAU 4
Résistance des souris transgéniques de la lignée C
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMIg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
	C1	M	20.4	-		-
	C2	M	14.2	-		-
	C3	F	19.3	-		-
	C4	F	18.5	-		-
	C5	F	24.3	-		-
	C6	F	21.8	-		-
	C7	F	24.0	-		-
	C8	F	20.6	-		-
	L1	M	1.3	-		-
	L2	M	0.9	+		+
	L3	M	1.6	+	6	
	L4	F	1.3	+	5	
	L5	F	1.4	+	5	
	L6	F	1.5	+	6	
	L7	F	1.6	+	5	

TABLEAU 4
Résistance des souris transgéniques de la lignée C
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
	C1	M	20.4	-		-
	C2	M	14.2	-		-
	C3	F	19.3	-		-
	C4	F	18.5	-		-
	C5	F	24.3	-		-
	C6	F	21.8	-		-
	C7	F	24.0	-		-
	C8	F	20.6	-		-
	L1	M	1.3	-		-
	L2	M	0.9	+		+
	L3	M	1.6	+	6	
	L4	F	1.3	+	5	
	L5	F	1.4	+	5	
	L6	F	1.5	+	6	
	L7	F	1.6	+	5	

TABLEAU 5

Neutralisation du virus HVS-1 par la protéine chimérique HVEMlg
dans le sérum de souris transgéniques de la lignée C.
Inoculation de virus HSV1 sur cellules VERO, après incubation avec des
concentrations variables de ce sérum

Serum (HVEMlg ug/ml)	Nombre de plages de lyse observées	
	HSV-1	PRV
(20.4)	0	108.0 \pm 8.8
(2.04)	0	-
(0.20)	1.7 \pm 1.6	-
(0.02)	34.7 \pm 16.2	-
(0.20) + anti HVEMlg	30.3 \pm 6.9	-
Contrôle	44.0 \pm 0	107.3 \pm 2.9

TABLEAU 5

Neutralisation du virus HVS-1 par la protéine chimérique HVEMlg
 dans le sérum de souris transgéniques de la lignée C.
 Inoculation de virus HSV1 sur cellules VERO, après incubation avec des
 concentrations variables de ce sérum

Serum (HVEMlg ug/ml)	Nombre de plages de lyse observées	
	HSV-1	PRV
(20.4)	0	108.0 ± 8.8
(2.04)	0	-
(0.20)	1.7 ± 1.6	-
(0.02)	34.7 ± 16.2	-
(0.20) + anti HVEMlg	30.3 ± 6.9	-
Contrôle	44.0 ± 0	107.3 ± 2.9

REVENDICATIONS

- 1°) Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale,
- 5 caractérisé en ce que
- l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère, un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire de l'alpha herpès virus visé ou de
- 10 l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.
- 2°) Procédé selon la revendication 1,
- caractérisé en ce que
- 15 l'immunoglobuline est une immunoglobuline de type gamma.
- 3°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2,
- caractérisé en ce que
- le récepteur de l'alpha herpès virus visé et/ou l'immunoglobuline appar-
- 20 tiennent à l'espèce homologue.
- 4°) Mammifère appartenant à une espèce non humaine,
- caractérisé en ce qu'
- il a été rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un
- 25 alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties, de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, de préférence de
- 30 l'espèce homologue.
- 5°) Mammifère selon la revendication 4,
- caractérisé en ce que
- le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est la nectin-1 ou HveC.
- 35
- 6°) Mammifère selon la revendication 5,
- caractérisé en ce que

REVENDECATIONS

- 1°) Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale,
- 5 caractérisé en ce que
l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère ou de l'un de ses ancêtres, un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire de
- 10 l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.
- 2°) Procédé selon la revendication 1,
- 15 caractérisé en ce que
l'immunoglobuline est une immunoglobuline de type gamma.
- 3°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que
- 20 le récepteur de l'alpha herpès virus visé et/ou l'immunoglobuline appartiennent à l'espèce homologue.
- 4°) Mammifère appartenant à une espèce non humaine, caractérisé en ce qu'
- 25 il a été rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties, de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline,
- 30 line, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, de préférence de l'espèce homologue.
- 5°) Mammifère selon la revendication 4, caractérisé en ce que
- 35 le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est la nectin-1 ou HveC.
- 6°) Mammifère selon la revendication 5, caractérisé en ce que

le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est le domaine V de la nectin-1 ou HveC.

7°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 6,
5 caractérisé en ce qu'
il appartient à l'espèce porcine et que l'alpha herpès virus est le virus PRV.

8°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 7,
caractérisé en ce qu'
10 il renferme dans le génome de ses cellules, un transgène codant pour une
protéine chimérique constituée d'une part du domaine extra cellulaire
d'un récepteur cellulaire de l' α -herpès virus visé ou de l'une de ses parties,
et d'autre part du fragment cristallisable d'une immuno globuline, dans
un système d'expression approprié, ce transgène ayant été inséré dans le
15 génome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est le domaine V de la nec-tin-1 ou HveC.

- 7°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 6,
5 caractérisé en ce qu'
il appartient à l'espèce porcine et que l'alpha herpès virus est le virus PRV.

- 8°) Descendant d'un mammifère selon l'une quelconque des revendica-tions 4 à 7,
10 caractérisé en ce qu'
il a hérité par descendance du transgène inséré dans le génome de la li-gnée germinale de l'un de ses parents.

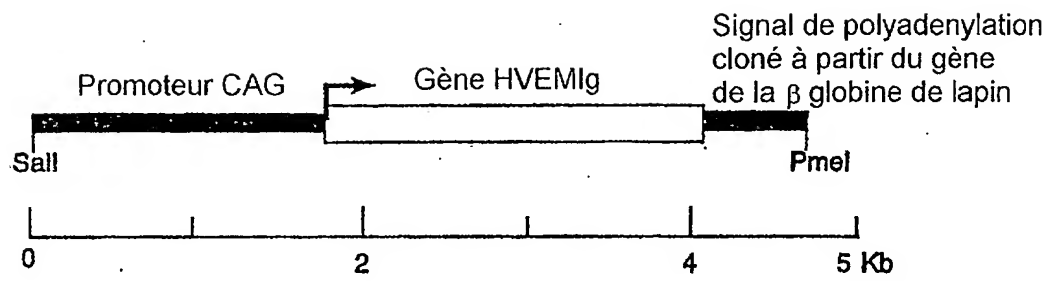


FIGURE 1

FIGURE 2

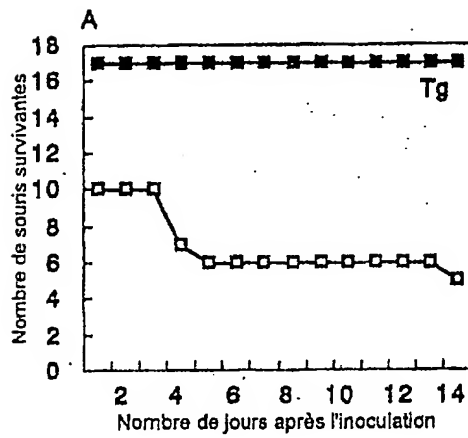


FIGURE 3

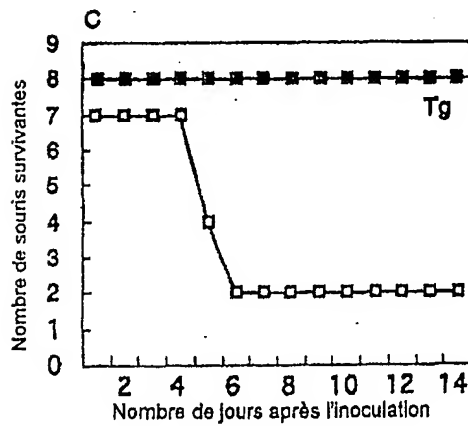
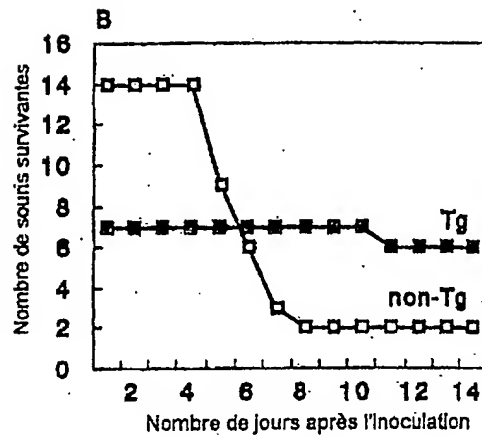


FIGURE 4

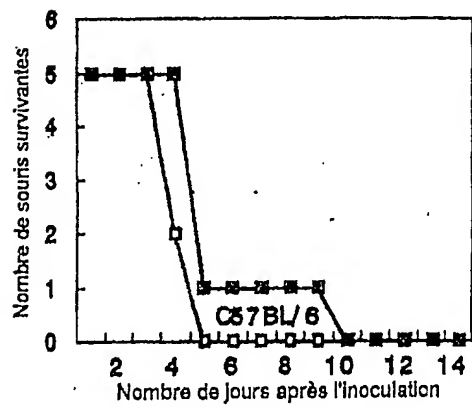


FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> FRANCE HYBRIDES

<120> Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé

<130> HVEMIg

<140> Fr02 12775

<141> 2002-10-15

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 439

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: récepteur HVEM cloné chez la souris et fraction IgG1 humaine

<400> 1

```

Met Glu Pro Leu Pro Gly Trp Gly Ser Ala Pro Trp Ser Gln Ala Pro
 1           5           10           15

Thr Asp Asn Thr Phe Arg Leu Val Pro Cys Val Phe Leu Leu Asn Leu
      20           25           30

Leu Gln Arg Ile Ser Ala Gln Pro Ser Cys Arg Gln Glu Glu Phe Leu
      35           40           45

Val Gly Asp Glu Cys Cys Pro Met Cys Asn Pro Gly Tyr His Val Lys
 50           55           60

Gln Val Cys Ser Glu His Thr Gly Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Pro
 65           70           75           80

Gln Thr Tyr Thr Ala His Ala Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Pro Cys
      85           90           95

Gly Val Cys Asp Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Trp Gln Glu Cys Ser
      100           105           110

Ser Trp Lys Asp Thr Val Cys Arg Cys Ile Pro Gly Tyr Phe Cys Glu
      115           120           125

Asn Gln Asp Gly Ser His Cys Ser Thr Cys Leu Gln His Thr Thr Cys
      130           135           140

Pro Pro Gly Gln Arg Val Lys Arg Gly Thr His Asp Gln Asp Thr Val

```

145	150	155	160
Cys Ala Asp Cys Leu Thr Gly Thr Phe Ser Leu Gly Gly Thr Gln Glu	165	170	175
Glu Cys Leu Pro Trp Thr Asn Cys Ser Ala Phe Gln Gln Glu Val Arg	180	185	190
Arg Gly Thr Asn Ser Thr Asp Thr Thr Cys Ser Ser Asp Pro Glu Glu	195	200	205
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	210	215	220
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	225	230	235
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	245	250	255
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	260	265	270
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	275	280	285
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	290	295	300
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	305	310	315
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	325	330	335
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys	340	345	350
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	355	360	365
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	370	375	380
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	385	390	395
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser	405	410	415
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	420	425	430
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435		

<210> 2
<211> 580
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: récepteur
HveC cloné chez le porc. et fraction IgG1 humaine

<400> 2
Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15
Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val
20 25 30
Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45
Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln
50 55 60
Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
85 90 95
Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser
100 105 110
Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
115 120 125
Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala
130 135 140
Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys
145 150 155 160
Lys Gly Lys Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn
165 170 175
Gly Lys Pro Pro Ser Val Val Ser Trp Glu Thr His Leu Lys Gly Glu
180 185 190
Ala Glu Tyr Gln Glu Ile Arg Asn Pro Asn Gly Thr Val Thr Val Ile
195 200 205
Ser Arg Tyr Arg Leu Val Pro Ser Arg Glu Asp His Arg Gln Ser Leu
210 215 220
Ala Cys Ile Val Asn Tyr His Met Asp Arg Phe Arg Glu Ser Leu Thr
225 230 235 240

Leu Asn Val Gln Tyr Glu Pro Glu Val Thr Ile Glu Gly Phe Asp Gly
 245 250 255
 Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Met Asp Val Lys Leu Thr Cys Lys Ala Asp
 260 265 270
 Ala Asn Pro Pro Ala Thr Glu Tyr His Trp Thr Thr Leu Asn Gly Ser
 275 280 285
 Leu Pro Lys Gly Val Glu Ala Gln Asn Arg Thr Leu Phe Phe Arg Gly
 290 295 300
 Pro Ile Asn Tyr Ser Met Ala Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Asn
 305 310 315 320
 Pro Ile Gly Thr Arg Ser Gly Gln Val Glu Val Asn Ile Thr Glu Phe
 325 330 335
 Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu His Ala Asp Pro Glu Glu Pro Lys
 340 345 350
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 355 360 365
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 370 375 380
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Val Val Val Asp Val Ser
 385 390 395 400
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 405 410 415
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 420 425 430
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 435 440 445
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 450 455 460
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 465 470 475 480
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 485 490 495
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 500 505 510
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 515 520 525
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 530 535 540

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
545 550 555 560

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
565 570 575

Ser Pro Gly Lys
580

<210> 3

<211> 376

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: domaine V
seul du recepteur Hvec cloné chez le porc et
fraction IgG1 porcine

<400> 3

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val
20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val
35 40 45

Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln
50 55 60

Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile
65 70 75 80

Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg
85 90 95

Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser
100 105 110

Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr
115 120 125

Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Gly
130 135 140

Ser Val Gly Ile His Gln Pro Gln Thr Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys
145 150 155 160

Glu Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
165 170 175

Thr Leu Met Ile Ser Gln Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

180	185	190
Val Ser Lys Glu His Ala Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly		
195	200	205
Val Glu Val His Thr Ala Glu Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn		
210	215	220
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp		
225	230	235
Leu Lys Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Val Asp Leu Pro		
245	250	255
Ala Pro Ile Thr Arg Thr Ile Ser Lys Ala Ile Gly Gln Ser Arg Glu		
260	265	270
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser		
275	280	285
Lys Val Thr Leu Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile		
290	295	300
His Val Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Thr Tyr		
305	310	315
Arg Thr Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Phe Phe Leu Tyr		
325	330	335
Ser Lys Leu Ala Val Asp Lys Ala Arg Trp Asp His Gly Asp Lys Phe		
340	345	350
Glu Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
355	360	365
Ser Ile Ser Lys Thr Gln Gly Lys		
370	375	



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 12 775
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
FRANCE HYBRIDES		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	Etsuro ONO, DVM, Ph.D.,
	Prénoms	
Adresse	Rue	Fukui 4-15-7 Nishi-ku
	Code postal et ville	[] [] [] [] Sapporo 063-0012 (JAPON)
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	Toshimitsu Uede, MD, Ph.D.,
	Prénoms	
Adresse	Rue	Shin-ei 5-3-8-2 Kiyota-ku
	Code postal et ville	[] [] [] [] Sapporo 004-0835 (JAPON)
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	[] [] [] []
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
23 Octobre 2002 CABINET HERRBURGER Pierre HERRBURGER CPI.92-1114		